

Vorrichtung zum Durchführen elektrophysiologischer  
Messungen an Zellen

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum Durchführen elektrophysiologischer Messungen an Zellen, mit einem Meßkopf, wobei der Meßkopf mit mindestens einer Elektrode zum Einstechen in die Zellen versehen ist.

Eine Vorrichtung der vorstehend genannten Art ist aus der US 6 048 722 A bekannt.

Express Mail Number

91418429096US

---

Die bekannte Vorrichtung dient zum Durchführen elektrophysiologischer Messungen an Oozyten, insbesondere Oozyten des *Xenopus laevis*, eines südafrikanischen Klauenfrosches. Diese Oozyten werden bevorzugt für elektrophysiologische Messungen als Expressionssystem eingesetzt. Hierzu werden die Oozyten in einer Aufnahme positioniert und fixiert. Die Aufnahme kann z.B. eine trichterartige Öffnung in einer Platte sein. Derartige Platten sind standardisiert und werden üblicherweise mit  $8 \times 12 = 96$ ,  $16 \times 24 = 384$  oder  $32 \times 48 = 1.536$  derartigen Aufnahmen ("Wells") verwendet. Die Aufnahmen für die Oozyten können z.B. an ihrer Unterseite mit einer Öffnung versehen sein, über die die Oozyte mittels Unterdruck angesaugt und in der Aufnahme fixiert wird.

Zum Durchführen von elektrophysiologischen Messungen wird eine genetische Information, nämlich eine mRNA oder eine cDNA, in die Oozyte eingebracht. Es bilden sich dann an der Oberfläche und in der Oozyte charakteristische Ionenkanäle und/oder Rezeptoren aus, die durch Anlegen einer elektrischen Spannung bzw. Durchleiten eines elektrischen Stroms oder Applikation einer Substanz vermessen werden können.

Es ist bekannt, auf diese Weise pharmakologische Messungen durchzuführen, weil die in der Membran der Oozyten ausgebildeten Rezeptoren oder Ionenkanäle in einer Art und Weise ausgebildet werden, die charakteristisch für bestimmte Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen ist.

Bei der eingangs erwähnten Vorrichtung gemäß der US 6 048 722 werden eine Meßelektrode und eine Referenzelektrode in die Zelle eingestochen. Zusätzlich ist an die Aufnahme der Zelle eine

Perfusionseinrichtung angeschlossen. Mit dieser Perfusions-einrichtung lassen sich in gesteuerter Weise unterschiedliche Substanzen, insbesondere Meßsubstanzen, in die Aufnahme einfüllen, die typischerweise ein Fassungsvermögen von 100  $\mu$ l hat.

Die bekannte Vorrichtung ist zwar hinsichtlich der Zufuhr von Perfusat automatisiert, es ist jedoch ein erhebliches handwerkliches Geschick erforderlich, um die Perfusatleitung in den Bereich der Aufnahme für die Zelle zu bringen und dort zu fixieren. Vor allem aber ist auch die Anbringung der Elektroden an der Zelle, insbesondere das Einstechen der Elektroden in die Zelle, von der Geschicklichkeit der jeweiligen Untersuchungsperson abhängig, da dies offensichtlich von Hand geschieht. Sofern die Applikation der Elektrode bzw. der Elektroden an die Zelle mißlingt, insbesondere wenn die Elektroden abbrechen, muß der gesamte Meßaufbau neu eingerichtet und neu justiert werden. Schließlich ist mit der bekannten Vorrichtung nur jeweils eine Einzelmessung an einer Zelle möglich, wobei lediglich die Abfolge unterschiedlicher Testflüssigkeiten in der erwähnten Weise automatisch gesteuert werden kann.

Der Erfindung liegt demgegenüber die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung der eingangs genannten Art dahingehend weiterzubilden, daß die vorstehend erläuterten Nachteile vermieden werden.

Insbesondere soll es möglich sein, die Messung sowohl hinsichtlich der Applikation der Elektroden wie auch hinsichtlich der Applikation der Perfusatleitungen vollautomatisch durchzuführen, weiterhin soll die Vorrichtung nach dem "plug-and-play"-Prinzip mit wenigen Handgriffen einsetzbar und bei einer eventuellen Beschädigung wieder-einsetzbar gemacht werden können.

Schließlich soll es möglich werden, eine Vielzahl von Messungen an vielen unterschiedlichen Zellen vollautomatisiert, d.h. ohne Aufsicht durchführen zu können, insbesondere über Nacht.

Diese Aufgabe wird gemäß der eingangs genannten Vorrichtung erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Elektroden in einen gemeinsamen Träger integriert sind.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß der Träger industriell vorgefertigt werden kann und lediglich in der Vorrichtung an eine entsprechende Halterung eingesteckt werden muß. Die Elektroden sind dabei fertig installiert, insbesondere hinsichtlich ihrer relativen Lage zueinander, so daß das bei herkömmlichen Vorrichtungen notwendige und sehr delikate Ausrichten der Elektroden zueinander nicht mehr erforderlich ist. Auf diese Weise wird erreicht, daß das Risiko einer Beschädigung der Elektroden beim Einrichten der Vorrichtung drastisch minimiert wird. Außerdem werden die Messungen deutlich reproduzierbar, weil die Elektroden sich in einer definierten Lage zueinander befinden. Schließlich gestattet die integrierte Anordnung der Elektroden in dem Träger, daß automatisierte Verfahreinrichtungen für den so gebildeten Meßkopf gebildet werden, so daß die gewünschten vollautomatisierten Messungen an einer Vielzahl von Zellen möglich werden, beispielsweise in Verbindung mit einer standardisierten Multi-Well-Platte.

Bei bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind die Elektroden in Aussparungen des Trägers eingesetzt, sie können aber auch im Träger vergossen sein.

Diese Maßnahmen haben den Vorteil, daß eine stabile und reproduzierbare Lage der Elektroden im Träger erreicht wird.

Bei weiteren Ausführungsformen der Erfindung bestehen die Elektroden aus gezogenen Glasröhrchen.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß derartige Glaselektroden in an sich bekannter Weise für den jeweiligen Anwendungszweck optimiert ausgebildet werden können. So ist es z.B. möglich, die Elektroden mit einem elektrischen Widerstand zwischen 5 M $\Omega$  und 100 M $\Omega$  auszubilden, und zwar als sogenannte "sharp electrodes". Alternativ können die Elektroden auch als sogenannte "patch electrodes" mit einem elektrischen Widerstand in der Größenordnung von 500 k $\Omega$  bis 5 M $\Omega$  ausgebildet werden.

Alternativ ist erfindungsgemäß aber auch vorgesehen, Elektroden als Drahtelektroden auszubilden, vorzugsweise als Silberdrahtelektroden, die weiter vorzugsweise mit einer Chloridschicht umgeben sind. Daneben ist auch die Verwendung von Wolframdrähten und dergleichen möglich.

Bei bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist mindestens eine Elektrode einen geraden Abschnitt auf.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß die Elektrode in besonders einfacher Weise im Träger befestigt werden kann.

Wenn in weiter bevorzugter Ausbildung der Erfindung zwei Elektroden im wesentlichen symmetrisch zu einer Längsachse des Trägers angeordnet sind, so kann man den Abstand zwischen den

freien Enden der Elektroden in einem Bereich zwischen etwa 50  $\mu\text{m}$  und 800  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise zwischen 200  $\mu\text{m}$  und 500  $\mu\text{m}$  einstellen.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß beim Einführen der Elektroden in die Zellen individuelle Einstechlöcher erzielt werden und nicht ein gemeinsames, großes Loch aufgerissen wird, das entstünde, wenn die freien Enden der Elektroden zu dicht beieinander angeordnet wären. Dies hätte nämlich den Nachteil, daß wichtige physiologische Funktionen der Zelle verlorengingen. Dies wird bei der erfindungsgemäßen Vorgehensweise vermieden.

In diesem Zusammenhang ist besonders bevorzugt, wenn ein gerader Abschnitt der Elektroden mit einer Längsachse des Trägers einen spitzen Winkel einschließt, der insbesondere zwischen  $3^\circ$  und  $10^\circ$ , vorzugsweise  $5^\circ$  betragen kann.

Diese zueinander geneigte Anordnung der Elektroden hat den Vorteil, daß die unteren freien Enden der Elektroden in gut reproduzierbarer Weise positioniert werden können.

Bei einer bevorzugten Gruppe von Ausführungsbeispielen der Erfindung ist mindestens eine der Elektroden als Meßelektrode ausgebildet. Die Meßelektrode ist vorzugsweise an einen Meßverstärker angeschlossen, der weiter vorzugsweise einstellbar ist.

Auf diese Weise ist es möglich, automatisch gesteuerte Messungen von Spannungs- oder Stromsignalen durchzuführen.

Dies gilt insbesondere dann, wenn die mindestens eine Meßelektrode an eine Stromquelle angeschlossen ist und diese wiederum vorzugsweise einstellbar ist.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß bei Einsatz zweier unterschiedlicher Elektroden eine Entkopplung zwischen der Stromeinleitung einerseits und der Spannungsmessung andererseits erreicht wird.

Die hier zu messenden Ströme und Spannungen liegen im nA- bis  $\mu$ A-Bereich für die Strommessung, und im mV-Bereich für die Spannungsmessung.

Diese Messungen können durch die gängigen elektrophysiologischen Meßmethoden wie "bridge-mode", "current-clamp", und "voltage-clamp" durchgeführt werden. Dabei ist es für diese Erfindung unerheblich, ob die voltage-clamp-Ableitung mit zwei Elektroden (two-electrode voltage clamp; TEVC) oder mit einer Elektrode (single-electrode voltage-clamp, SEVC) durchgeführt wird. Bei der SEVC-Methode wird im sogenannten "switched-mode" gemessen, also abwechselnd wird in einem bestimmten Intervall ein Meßstrom eingeleitet und die Meßspannung (bei abgeschalteter Strominjektion) gemessen.

Zu diesem Zweck ist bei weiteren Ausführungsbeispielen bevorzugt, wenn mindestens eine der Elektroden als Referenzelektrode ausgebildet ist. In diesem Fall ist vorzugsweise die Referenzelektrode an eine Masse angeschlossen.

Zu dem erwähnten Zweck sind Konfigurationen besonders bevorzugt, bei denen zwei Meßelektroden und zwei Referenzelektroden vorgesehen sind.

In diesem Falle ist besonders bevorzugt, wenn mindestens zwei Meßelektroden in einer ersten gemeinsamen Ebene und/oder mindestens zwei Referenzelektroden in einer zweiten gemeinsamen Ebene angeordnet sind und weiter vorzugsweise die erste und die zweite Ebene parallel zueinander verlaufen und einen möglichst geringen Abstand zueinander aufweisen.

Diese Maßnahmen haben den Vorteil, daß ein extrem kompakter und von der Meßtechnik her optimaler Aufbau entsteht, bei dem alle erforderlichen Komponenten auf engstem Raum vereinigt sind.

Bei einer weiteren Gruppe von Ausführungsbeispielen ist auf dem Träger mindestens eine Perfusatsleitung angeordnet.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß die Perfusionseinrichtung hinsichtlich der Zuführung und Abführung des Perfusats in denselben Meßkopf integriert ist, in dem sich bereits die Elektroden befinden, so daß eine gemeinsame Handhabung möglich ist. Weiterhin ist von Vorteil, daß beim Integrieren auch der Perfusatsleitungen in den Meßkopf die relative Positionierung der Perfusatsleitungen zu den Elektroden optimiert werden kann und bereits herstellerseitig fixiert ist. Auch insoweit entfällt ein umständliches Handhaben der Vorrichtung beim Aufbau der Meßanordnung. Weiterhin ergibt sich der Vorteil, daß bei einer Beschädigung einer der Komponenten auch hier der gesamte Meßkopf mit wenigen Handgriffen ausgetauscht werden kann.



Bei Varianten dieser Gruppe von Ausführungsbeispielen kann die mindestens eine Perfusatsleitung ein Perfusateinlaß sein.

In diesem Fall ist besonders bevorzugt, wenn der Perfusateinlaß eine erste Mündung aufweist, der Perfusateinlaß ferner im wesentlichen parallel zu der mindestens einen Elektrode angeordnet ist und schließlich die erste Mündung oberhalb eines unteren Endes der mindestens einen Meßelektrode angeordnet ist.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß das Perfusat ganz gezielt an exakt die Stelle geleitet wird, an der sich der aktive Teil der Meßelektroden befindet.

Dies gilt insbesondere dann, wenn der Perfusateinlaß bei der bereits weiter oben erwähnten symmetrischen Anordnung der Elektroden im wesentlichen auf der Symmetrieachse zwischen den Meßelektroden angeordnet ist.

Es ist weiterhin in diesem Zusammenhang bevorzugt, wenn der Perfusateinlaß an eine Förderpumpe angeschlossen und diese insbesondere einstellbar ist.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß das Perfusat in genau dosierter Weise zugeführt werden kann.

Bei weiteren Varianten dieses Ausführungsbeispiels ist der Perfusateinlaß über ein steuerbares Ventilsystem an eine Mehrzahl von Vorratsbehältern anschließbar, die eine Testflüssigkeit oder eine Spülflüssigkeit enthalten können.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß hinsichtlich der Perfusionseinrichtung vollautomatisierte Messungen mit den bereits erwähnten Vorteilen durchgeführt werden können.

Besonders ist bevorzugt, wenn die Vorratsbehälter oberhalb des Perfusateinlasses angeordnet sind.

Dann ist es nämlich möglich, auf die Förderpumpe zu verzichten, weil dann nach Öffnen des Ventils in der entsprechenden Verbindungsleitung die Test- oder Spülflüssigkeit von selbst unter Schwerkrafteinfluß zum Perfusateinlaß strömt.

Bei einer weiteren Gruppe von Ausführungsbeispielen ist die Perfusatleitung ein Perfusatauslaß.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß das nicht mehr benötigte Perfusat kontrolliert abgeführt und insbesondere ein Überlaufen der Aufnahme für die Zelle verhindert werden kann.

Zu diesem Zweck weist der Perfusatauslaß vorzugsweise eine zweite Mündung auf, die oberhalb der ersten Mündung angeordnet ist.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß die Zelle über die Strecke zwischen den beiden Mündungen stets mit frischem Perfusat versorgt werden kann, d.h. entweder mit einer Testflüssigkeit oder zwischen den Meßvorgängen mit einer Spülflüssigkeit.

Weiterhin hat diese Maßnahme den Vorteil, daß auch außerhalb von eigentlichen Meßvorgängen ein gezieltes Zuführen von Perfusat möglich ist, um die gerade nicht vermessenen Zellen gegen

Austrocknen zu schützen. Dann kann über den vertikalen Abstand der beiden Mündungen in genau definierter Weise ein vorgegebener Flüssigkeitsspiegel oberhalb der Zellen eingestellt werden.

Eine besonders gute Wirkung wird erzielt, wenn die Mündungen entgegengesetzt gerichtet sind.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß ein Kurzschluß zwischen dem Einlaß- und dem Auslaßsystem verhindert wird, wenn in entgegengesetzten Richtungen eingelassen bzw. abgesaugt wird.

Auch in diesem Falle ist sinngemäß bevorzugt, wenn der Perfusatauslaß an eine Saugpumpe angeschlossen und diese insbesondere einstellbar ist.

Eine besonders gute Wirkung wird erzielt, wenn in Blickrichtung auf die erste Ebene der Perfusateinlaß vor der ersten Ebene und der Perfusatauslaß hinter der zweiten Ebene angeordnet ist.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß ein extrem kompakter und sicherer Aufbau entsteht, bei dem alle für die Messung erforderlichen Komponenten in optimaler Weise zusammenarbeiten.

Bei Ausführungsbeispielen der Erfindung ist bevorzugt, wenn mindestens ein Meßkopf an einem Aktuator angeordnet ist und der Aktuator entlang eines Koordinatensystems oberhalb einer Aufnahme für die Zellen verfahrbar ist.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß der Meßkopf in allen Richtungen des Koordinatensystems vollautomatisch verfahren werden kann, so daß alle notwendigen Bewegungen programmiert durchge-

führt werden können. Dies betrifft insbesondere das Anstechen der Zellen mittels der Meßelektroden, aber auch das Heranfahren des Meßkopfes an die Zellen, wenn lediglich eine Befeuchtung der Zellen mittels Perfusat gewünscht ist, wie dies vorstehend erläutert wurde.

In einer bevorzugten Weiterbildung dieses Ausführungsbeispiels kann der Aktuator eine Mehrzahl von Meßköpfen tragen.

Diese Maßnahme hat insbesondere bei der Verwendung von sogenannten Multi-Well-Platten den Vorteil, daß mehrere Zellen entlang einer Reihe oder einer Spalte der Platte parallel und gleichzeitig gemessen werden können, so daß die in den Wells der Platte enthaltenen Zellen insgesamt in einem Bruchteil der ansonsten benötigten Zeit gemessen werden können. Dabei kann selbstverständlich innerhalb der verschiedenen Aufnahmen für die Zellen mit unterschiedlichen Perfusaten gearbeitet werden, d.h. mit unterschiedlichen Testflüssigkeiten oder mit Spülflüssigkeiten. Wenn unterschiedliche Testflüssigkeiten verwendet werden, kann dies bedeuten, daß an sich dieselbe Art Testflüssigkeit, jedoch in unterschiedlicher Konzentration, verwendet wird, oder aber es können Testflüssigkeiten ganz unterschiedlicher Art eingesetzt werden.

Zu diesem Zweck ist es zweckmäßig, wenn die Meßköpfe relativ zum Aktuator mindestens entlang der auf die Zelle gerichteten Achse individuell verfahrbare sind.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß die Bewegungsvorgänge an einer Zelle individuell eingestellt werden können, auch wenn in

der geschilderten Weise mehrere Zellen parallel vermessen werden.

Bei einer besonders bevorzugten Ausbildung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist der Meßkopf steckbar oder schraubbar am Aktuator befestigt.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß ein schneller Austausch des Meßkopfs möglich ist, ohne daß der gesamte Versuchsaufbau verändert werden muß.

In weiterer bevorzugter Ausgestaltung der Erfindung sind Mittel zum Injizieren von cDNA und/oder mRNA in die Zelle vorgesehen. Dies geschieht vorzugsweise dadurch, daß diese Mittel am Aktuator angeordnet sind.

Diese Maßnahmen haben den Vorteil, daß auch während des an sich bekannten Schritts des Injizierens dies in der erwähnten Weise automatisiert und gegebenenfalls für eine Vielzahl von Zellen gesteuert nacheinander stattfinden kann.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Erfindung in besonders vorteilhafter Weise dann eingesetzt werden kann, wenn die Aufnahme für die Zellen als standardisierte Multi-Well-Platte ausgebildet ist.

In diesem Fall wird eine besonders gute Wirkung dann erzielt, wenn die einzelnen Aufnahmen in der Platte mit einer lesbaren Codierung versehen sind und der Aktuator Mittel zum Lesen der Codierung umfaßt. Dies gilt vor allem dann, wenn die Codierung

eine Bar-Codierung ist und die Mittel ein Bar-Code-Lesekopf sind.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß die erfindungsgemäße Vorrichtung zu Beginn des automatisierten Meßvorganges für viele Zellen an einer bestimmten, vorbestimmten Zelle in einem vorbestimmten Well beginnen kann und dann je nach Programmierung ihren Weg über die Mult-Well-Platte fortsetzt. An jeder einzelnen Aufnahme, insbesondere an jedem einzelnen Well, kann dann durch Lesen des Bar-Codes überprüft werden, ob die Position des Meßkopfes insoweit korrekt ist.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der Beschreibung und der beigefügten Zeichnung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in der Zeichnung dargestellt und werden in der nachfolgenden Beschreibung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine Draufsicht auf einen Teil einer Multi-Well-Platte, wie sie vorteilhaft im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann;

- Fig. 2 eine Seitenansicht, teilweise im Schnitt, entlang der Linie II-II von Fig. 1, durch ein Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung;
- Fig. 3 in noch weiter vergrößertem Maßstab eine Vorderansicht eines Meßkopfes, wie er in der Vorrichtung gemäß Fig. 2 verwendet werden kann;
- Fig. 4 eine Seitenansicht, teilweise im Schnitt, durch den Meßkopf gemäß Fig. 3;
- Fig. 5 in noch weiter vergrößertem Maßstab eine Schnittdarstellung entlang der Linie V-V von Fig. 4 zur Erläuterung weiterer Einzelheiten des dort dargestellten Meßkopfes; und
- Fig. 6 einen Aufschrieb einer Messung, wie sie mit der Vorrichtung gemäß Fig. 2 bis 5 durchführbar ist.

In Fig. 1 bezeichnet 10 insgesamt eine sogenannte Well-Platte, wie sie bei elektrophysiologischen Messungen an Oozyten verwendet wird. Well-Platten 10 sind standardisiert und enthalten eine Vielzahl von Wells 12, d.h. Aufnahmen für Oozyten. Standardisierte Well-Platten 10 sind mit Wells 12 in Reihen und Spalten versehen, wobei Formate von  $8 \times 12 = 96$ ,  $16 \times 24 = 384$  oder  $32 \times 48 = 1.536$  Wells üblich sind.

Zum Auffinden und Identifizieren einzelner Wells 10 sind Codierungen vorgesehen, von denen in Fig. 1 eine bei 13 als Bar-Code angedeutet ist.

Die Reihen und Spalten der Wells 12 in der Well-Platte 10 definieren ein Koordinatensystem 14, bei standardisierten Well-Platten 10 ist dies ein kartesisches Koordinatensystem mit Achsen x und y.

In Fig. 1 ist in den Wells 12 bei 16 jeweils eine Oozyte angedeutet. Bei elektrophysiologischen Messungen der hier interessierenden Art werden üblicherweise Oozyten des südafrikanischen Klauenfrosches (*Xenopus laevis*) verwendet. Diese Oozyten 16 haben einen Durchmesser von ca. 1 mm. Die Wells 12 sind, wie auch aus der Schnittdarstellung gemäß Fig. 2 ersichtlich ist, von gewölbter Gestalt, die sich vorzugsweise nach unten hin verjüngt.

Um die Oozyten 16 in den Wells 12 zu fixieren, kann vorgesehen sein, die Wells 12 am tiefsten Punkt mit einem Kanal an ein Unterdrucksystem anzuschließen (in den Figuren nicht dargestellt), um die Oozyten 16 in den Wells 12 mittels Unterdruck zu fixieren.

In Fig. 1 und 2 ist mit 18 ein Aktuator angedeutet, der entlang der Ebenenkoordinaten x und y, aber auch entlang einer dazu senkrechten Koordinate z verfahrbar ist. Zu diesem Zweck ist der Aktuator 18 an ein elektronisches Steuergerät (nicht dargestellt) angeschlossen, das entsprechenden Bewegungseinheiten für die drei Koordinaten x, y und z die erforderlichen Steuerbefehle zuleitet. Diese dreidimensionale Bewegungsmöglichkeit des Aktuators 18 ist in Fig. 2 bei 21 nochmals angedeutet.

Der Aktuator 18 weist an seiner Unterseite einen Lesekopf 19 auf. Der Lesekopf 19 ist z.B. als Bar-Code-Leser ausgebildet.



Er ist imstande, die Codierung 13 an jedem Well 12 zu identifizieren, so daß jedes Well 12 in seinen Koordinaten auf der Well-Platte 10 identifiziert werden kann.

Der Aktuator 18 trägt einen Meßkopf 20, mit dem in noch zu beschreibender Weise die Messungen an den Oozyten 16 durchgeführt werden. Der Meßkopf 20 weist einen Träger 22 auf, in den die dazu erforderlichen Elemente integriert sind, wie weiter unten anhand der Fig. 3 bis 5 noch im einzelnen erläutert werden wird. Der Träger 22 hat eine Längsachse 24, die im dargestellten Ausführungsbeispiel mit der vertikalen z-Achse zusammenfällt.

In Fig. 2 ist mit 20a und 20b noch angedeutet, daß oberhalb der Well-Platte 10 nicht nur ein Meßkopf 20 sondern auch mehrere Meßköpfe 20, 20a, 20b ... angeordnet sein können. Vorzugsweise sind die Meßköpfe 20, 20a, 20b in einer Reihe angeordnet, so daß gleichzeitig eine Mehrzahl von Oozyten 16 in ihren Wells 12 vermessen werden können. Dies kann beispielsweise eine komplette Reihe oder Spalte von Wells 12 in der Well-Platte betreffen.

Vorzugsweise wird dabei so vorgegangen, daß zwar die gesamte Reihe von Meßköpfen 20, 20a, 20b gemeinsam über die Well-Platte 10 verfahren wird, um nacheinander verschiedene Reihen bzw. Spalten von Wells 12 anzufahren. Bevorzugt bleibt dabei jedoch, daß zumindest der z-Antrieb jedes Aktuators 18 für jeden einzelnen Meßkopf 20, 20a, 20b ... individuell steuerbar bleibt, damit nach dem Anfahren der Wells 12 die eigentliche Messung an jeder Oocyte 16 individuell durchgeführt werden kann.

In den Fig. 3 bis 5 ist der Meßkopf 20 in weiteren Einzelheiten dargestellt.

Jeder Meßkopf 20 weist dabei eine erste Elektrode 30, eine erste Referenzelektrode 32, eine zweite Elektrode 34 sowie eine zweite Referenzelektrode 36 auf.

Wie man aus der vergrößerten Querschnittsdarstellung gemäß Fig. 5 erkennen kann, liegen die beiden Elektroden 30 und 34 in einer gemeinsamen ersten Ebene 35, und die beiden Referenzelektroden 32 und 36 in einer zweiten Ebene 37. Die beiden Ebenen 35 und 37 erstrecken sich parallel zueinander und haben voneinander einen Abstand D.

In dem Träger 22 befindet sich ferner ein Perfusionseinsatz 38 mit einer unteren Mündung 39 sowie ein Perfusatauslaß 40 mit einer unteren Mündung 41. In Blickrichtung auf die erste Ebene 35 liegt der Perfusateinlaß 38 vor der ersten Ebene 35 und der Perfusatauslaß 40 hinter der zweiten Ebene 37. Der Perfusateinlaß 38 und der Perfusatauslaß 40 liegen in der Mittelebene zwischen den Elektroden 30, 34 und den Referenzelektroden 32 und 36. Diese fällt mit der Längsachse 24 des Trägers 22 zusammen.

Die Elektroden 30 und 34 weisen jeweils einen geraden Abschnitt 42 bzw. 46 auf und laufen unten in eine Spitze 44 bzw. 48 aus. Die geraden Abschnitte 42, 46 sind zur Längsachse 24 des Trägers 22 geneigt, und zwar unter einem Winkel  $\alpha$ , der vorzugsweise zwischen  $3^\circ$  und  $10^\circ$ , insbesondere  $5^\circ$  beträgt.

Die Anordnung ist dabei so gewählt, daß die Spitzen 44 und 48 einen sehr geringen Abstand  $d$  voneinander haben, der zwischen  $200\text{ }\mu\text{m}$  und  $500\text{ }\mu\text{m}$  beträgt. Demgegenüber liegt der Abstand  $d$  zwischen den Ebenen 35 und 37 in der Größenordnung von  $1\text{ mm}$ .

Die Referenzelektroden 32 und 36 liegen in Fig. 3 hinter den Meßelektroden 30, 34 und sind in gleicher Weise geneigt angeordnet.

Die Elektroden 30 und 34 dienen, wie erwähnt, als Meß- bzw. Ableitelektroden. Sie können als sogenannte Glaselektroden aus gezogenen Glasröhrchen bestehen. Diese werden im elektrophysiologischen Sprachgebrauch als "sharp electrodes" bezeichnet, wenn sie einen elektrischen Widerstand in der Größenordnung von  $5$  bis  $100\text{ M}\Omega$  aufweisen oder als "patch electrodes", wenn ihr elektrischer Widerstand in der Größenordnung von  $500\text{ k}\Omega$  bis  $5\text{ M}\Omega$  liegt. Die sogenannten "patch electrodes" werden in der Praxis sowohl zum Einstecken wie auch zum Ansaugen verwendet. Alternativ können aber auch Drahtelektroden verwendet werden, die z.B. aus Wolfram bestehen und die als "wire electrodes" bezeichnet werden.

Die Referenzelektroden 32 und 36 sind hingegen vorzugsweise als Drahtelektroden ausgebildet. Zu diesem Zweck können Silberdrähte verwendet werden, die mittels eines elektrolytischen Prozesses mit einer Chloridschicht versehen sind. Derartige Elektroden werden als Ag/AgCl-Elektroden bezeichnet.

Die Perfusatleitungen 38 und 40 sind als Schläuche ausgebildet.

Die sechs vorgenannten Elemente 30, 32, 34, 36, 38 und 40 sind in der in Fig. 5 dargestellten Weise in den Träger 22 des Meßkopfes 20 integriert. Unter "integriert" können dabei verschiedene Anbringungsarten verstanden werden. So können die Elemente in entsprechende Bohrungen, Ausnehmungen, Ausfräsungen und dergleichen innerhalb eines einstückigen Trägerkörpers eingelegt, eingesteckt oder sonstwie fixiert sein. Es ist aber auch möglich, die genannten Elemente gesamthaft in einen Träger 22 einzugießen. Wichtig ist allein, daß alle genannten Elemente, d.h. alle Elektroden und Perfusatsleitungen, nach Lage und Abmessungen im Träger 22 fixiert sind, so daß sie als "plug-and-play"-Einheit leicht montiert und gegebenenfalls ausgetauscht werden können. Hierzu ist der Träger 22 vorzugsweise an den Meßkopf 20 ansteckbar oder sonstwie in lösbarer Weise zu befestigen.

In Fig. 3 und 4 ist noch die zugehörige Verschaltung der vorerwähnten Elemente angedeutet.

So erkennt man, daß die erste Meßelektrode 30 an eine Stromquelle 50 angeschlossen ist, die über einen Steueranschluß 52 einstellbar ist. Die Stromquelle 50 liefert einen Strom  $I$  an die erste Meßelektrode 30.

Die zweite Meßelektrode 34 ist hingegen an einen Meßverstärker 56 angeschlossen, der einen Steuereingang 58 aufweist. Im Meßverstärker 56 wird das von der zweiten Meßelektrode 34 erfaßte Spannungssignal  $U$  verstärkt und/oder sonstwie weiterverarbeitet.

Der Perfusateinlaß 38 ist mit einer Förderpumpe 70 verbunden, die ihrerseits einen Steuereingang 72 aufweist. Die Förderpumpe

70 kann über ein entsprechendes Ventilsystem an eine Vielzahl von Vorratsbehältern angeschlossen sein, in denen sich verschiedenartige Meß- und Spülsubstanzen befinden.

Der Perfusatauslaß 40 ist demgegenüber an eine Saugpumpe 74 angeschlossen, die einen Steuereingang 76 aufweist.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist ferner mit Elementen versehen, die es gestatten, die zu messenden Oozyten 16 mit einer cDNA und/oder einer mRNA zu impfen. Die hierzu erforderlichen Bauelemente sind vorzugsweise ebenfalls mit dem Aktuator 18 gekoppelt, um auch diese zu jeder einzelnen Oocyte 16 in jedem vorgewählten Well 12 fahren zu können.

Mit Hilfe der vorstehend erläuterten Vorrichtung können folgende Messungen durchgeführt werden:

Zunächst werden in die beispielsweise 96 Wells 12 der Well-Platte 10 Oozyten 16 eingebracht. Die Oozyten 16 werden dann sequentiell oder zu Gruppen gleichzeitig mit cDNA oder mRNA versehen, indem diese Substanzen in die Oozyten 16 injiziert werden. Die Oozyten werden dann inkubiert, z.B. über zwei oder mehr Tage hinweg.

Für die sich nun anschließende Messung wird der Aktuator 18 zunächst entlang des Koordinatensystems 14, d.h. in x- und y-Richtung oberhalb der Well-Platte 10 verfahren, bis er ein vorgewähltes Well 12 erreicht hat, was durch Lesen des entsprechenden Bar-Codes 13 erkannt wird.

In dieser Position wird der Meßkopf 20 durch Verfahren der z-Achse abgesenkt, bis sich die Spitzen 44, 48 oberhalb der Oozyte 16 befinden.

Die Anordnung arbeitet nun zunächst im "current clamp"-Betrieb, in dem der Strom im nA- bis  $\mu$ A-Bereich konstant gehalten wird. Dies geschieht durch Einstellen der Stromquelle 50 über den Steuereingang 52. Die Stromquelle 50 ist hier als Idealstromquelle angenommen, so daß der einmal eingestellte Strom I selbsttätig konstant gehalten wird.

Infolge des zu diesem Zeitpunkt relativ niedrigen Widerstandes stellt sich an der Meßelektrode 34 eine relativ geringe Meßspannung U ein, die im Verstärker 56 erfaßt wird.

Der Meßkopf 20 wird nun weiter in z-Richtung abgesenkt, bis die Spitzen 44, 48 in die Oozyte 16 eindringen. Dabei entstehen zwei um den Abstand d beabstandete Löcher in der Oozyte 16.

Aufgrund des sich schlagartig vergrößernden Widerstandes tritt nun ein erheblicher Spannungssprung in der Meßspannung U auf.

Die Anordnung schaltet nun vom "current clamp"-Betrieb in den "voltage clamp"-Betrieb um. In dieser Betriebsweise wird die Spannung U im Meßverstärker 56 dadurch konstant gehalten, daß der Strom I über die steuerbare Stromquelle 50 jeweils entsprechend nachgeregelt wird.

In diesem Augenblick ist die Förderpumpe 70 an ein Vorratsgefäß für eine Testsubstanz angeschlossen, oder die Testsubstanz steht unter Schwerkraft von selbst am Perfusateinlaß 38 an. Die

Förderpumpe 70 wird nun über den Steuereingang 72 eingeschaltet (und/oder ein entsprechendes Ventil in der Zuleitung zum Perfusateinlaß 38 geöffnet), so daß eine Testsubstanz einströmen kann, wie in Fig. 4 mit Pfeilen angedeutet. Die Testsubstanz fließt durch den Perfusateinlaß 38 und unten aus der Mündung 39 hinaus. Die Mündung 39 ist dabei so gerichtet, daß die Testsubstanz waagerecht in Fig. 4 nach links abströmt. Gleichzeitig wird die Saugpumpe 74 eingeschaltet, so daß überschüssige Testsubstanz über die Öffnung 41 und den Perfusatauslaß 40 abgesaugt werden kann. Auch die Öffnung 41 ist waagerecht gerichtet, jedoch zur Öffnung 39 entgegengesetzt. Dies bewirkt, daß ein Kurzschluß zwischen den Öffnungen 39 und 41 weitgehend vermieden wird.

Insgesamt wird auf diese Weise erreicht, daß die Testsubstanz die Oozyte 16 mit einem vorwählbaren Niveau überdeckt, das durch den vertikalen Abstand der Öffnungen 39 und 41 zueinander bestimmt ist.

Durch das Aufbringen der Testsubstanz verändert sich die Oozyte 16, indem Ionenkanäle geöffnet werden.

Aufgrund dessen treten Stromänderungen im nA- bis  $\mu$ A-Bereich auf, die über den Meßverstärker 56 gemessen und anschließend aufgezeichnet werden.

In Fig. 6 erkennt man ein zugehöriges Meßprotokoll 80. Das Meßprotokoll 80 ist in Zeilen 82 und Spalten 84 unterteilt, die der Verteilung der Wells 12 in der Well-Platte 10 entsprechen. Im dargestellten Beispiel umfaßt das Meßprotokoll 80 bei einer

96 Well-Platte Zeilen 82 mit zwölf Positionen 1 bis 12 sowie Spalten 84 mit acht Positionen A bis H.

In Fig. 6 ist ein erstes Feld mit den Koordinaten C2 mit 86, ein zweites Feld mit den Koordinaten A3 mit 88 und ein drittes Feld mit den Koordinaten E1 mit 90 bezeichnet.

Im ersten Feld 86 erkennt man einen Stromverlauf vor und während der Applikationszugabe, der bei einer erfolgreichen Messung der Oozyte 16 entspricht, die sich im Well 12 an der Koordinatenposition C2 befindet.

Das zweite Feld 88 hingegen kennzeichnet eine erfolglose Messung, die dort symbolisch mit einem Kreis angedeutet ist.

Das Meßprotokoll 80 zeigt den Zustand, bei dem gerade die Wells 12 bis hin zum Well an der Koordinatenposition D4 erfaßt worden sind. Alle darauffolgenden Wells 12 sind noch nicht vermessen, wie z.B. im dritten Feld 90 mit einem kreisförmigen Flecken angedeutet ist.

Der Benutzer der Vorrichtung kann daher durch Betrachten des Meßprotokolls 80 unmittelbar erkennen, in welchen Wells erfolgreiche Messungen durchgeführt werden konnten, in welchen Wells die Messungen erfolglos waren und welche Wells noch nicht untersucht worden sind.

Wenn für ein bestimmtes Well 12 die Messung abgeschlossen ist, wird der Meßkopf 20 in z-Richtung wieder angehoben, und es kann nun durch Umschalten des Eingangs der Förderpumpe 70 auf ein anderes Vorratsgefäß, in dem sich eine Spülflüssigkeit befin-



det, diese Spülflüssigkeit dem Well 12 zugeführt werden. Die Spülflüssigkeit wird nun im Durchlaufverfahren durch den Perfusateinlaß 38 zugeführt und etwas oberhalb mit dem Perfusat- auslaß 40 wieder abgesaugt, bis schlußendlich die Oozyte 16 vollkommen gespült ist und alle Spuren der zuvor eingebrachten Meßsubstanz beseitigt sind.

Es kann sich dann eine weitere Messung anschließen, in der eine andere Meßsubstanz in der bereits beschriebenen Weise zugeführt wird. Die andere Meßsubstanz kann dabei die gleiche Meßsubstanz wie zuvor, jedoch in anderer Konzentration sein, es können jedoch auch völlig andere Meßsubstanzen zugeführt werden.

Es versteht sich ferner, daß die vorstehend erläuterten Meß- und Spülschritte auch alle in derselben Vertikalstellung z des Meßkopfes 20 vorgenommen werden können, je nachdem, wie dies die Umstände des Einzelfalls zweckmäßig erscheinen lassen.

Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung können jedoch auch noch andere Funktionen außerhalb der eigentlichen Messungen durchgeführt werden:

Die in den Wells 12 befindlichen Oozyten 16 werden nämlich über längere Zeiträume nicht vermessen und daher nicht mit Testflüssigkeiten versehen, so daß die Oozyten 16 während dieser längeren Pausen Gefahr laufen, auszutrocknen. Diese Gefahr besteht beispielsweise während der typischerweise zweitägigen Inkubationszeit nach dem anfänglichen Injizieren mit cDNA/mRNA. Weitere längere Pausen können zwischen aufeinanderfolgenden Messungen entstehen, wenn nur ein Meßkopf 20 eingesetzt wird und nachein-

ander die 96, 384 oder gar 1.536 Wells 12 genormter Well-Platten 10 vermessen werden.

Um während dieser längeren Pausen vor den eigentlichen Messungen oder zwischen zwei Messungen ein Austrocknen der Oozyten 16 zu verhindern, kann der Meßkopf 20 in der bereits erwähnten Weise mittels des Aktuators 18 über die in Frage kommenden Wells 12 gefahren werden, damit dann über das Perfusionssystem 38/40 eine Flüssigkeit auf die Oozyten 16 gebracht werden kann, die deren Austrocknen sicher verhindert.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird der Meßkopf 20 herstellerseitig gefertigt. Dies bedeutet, daß alle Einzelkomponenten herstellerseitig auf dem Meßkopf 20 montiert und unter mikroskopischer Kontrolle ausgerichtet werden. Der so gefertigte Meßkopf 20 wird dann dem Benutzer übergeben. Dieser kann den Meßkopf 20 mit wenigen Handgriffen am Aktuator 18 befestigen bzw. bei Bedarf austauschen. Der Meßkopf 20 kann sofort, nach Befüllen der Ableitelektroden 30, 34 mit entsprechend leitfähigen Lösungen, auf der z-Achse montiert werden. Nach Anschließen der elektrischen Verbindungen und des Perfusionssystems kann sofort mit dem Meßvorgang begonnen werden. Diese "plug-and-play"-Eigenschaft des Meßkopfes 20 stellt eine wesentliche Erleichterung für den Anwender dar. Im Gegensatz zu herkömmlichen Vorrichtungen braucht der Anwender nämlich die Elektroden nicht selbst herzustellen, diese auszurichten, einzelne Elektroden zu chlorieren und die Referenzelektroden anzupassen. Schließlich entfällt auch die Anbringung und Positionierung der Perfusatleitungen.

Es versteht sich, daß bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung der Meßkopf 20 mit beliebigen Kombinationen von Elektroden und Perfusatleitungen versehen werden kann. Besonders bevorzugt ist im vorliegenden Fall jedoch die Anordnung mit insgesamt sechs Elementen, wie sie in Fig. 5 im einzelnen dargestellt sind.

Der Meßkopf 20 wird zwar bevorzugt in automatischen Aktuatoren oder Robotersystemen eingesetzt, kann aber auch in herkömmlichen manuellen Systemen, insbesondere sogenannten Mikromanipulatoren eingesetzt werden.

100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2617 2618 2619 2620 2621 2622 2623 2624 2625 2626 2627 2628 2629 2630 2631 2632 2633 2634 2635 2636 2637 2638 2639 2640 2641 2642 2643 2644 2645 2646 2647 2648 2649 2650 2651 2652 2653 2654 2655 2656 2657 2658 2659 2660 2661 2662 2663 2664 2665 2666 2667 2668 2669 2670 2671 2672 2673 2674 2675 2676 2677 2678 2679 2680 2681 2682 2683 2684 2685 2686 2687 2688 2689 2690 2691 2692 2693 2694 2695 2696 2697 2698 2699 2700 2701 2702 2703 2704 2705 2706 2707 2708

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Durchführen elektrophysiologischer Messungen an Zellen (16), mit einem Meßkopf (20), wobei der Meßkopf (20) mit mindestens einer Elektrode (30 - 36) zum Einstechen in die Zellen (16) versehen ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (30 - 36) in einen gemeinsamen Träger (22) integriert sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (30 - 36) in Aussparungen des Trägers eingesetzt sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (30 - 36) im Träger vergossen sind.
4. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (30, 34) aus gezogenen Glasröhrchen bestehen.
5. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (30, 34) einen elektrischen Widerstand zwischen 5 M und 100 M aufweisen.

6. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (30, 34) einen elektrischen Widerstand zwischen 500 K $\Omega$  und 5 M $\Omega$  aufweisen.
7. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (30 - 36) als Drahtelektroden ausgebildet sind.
8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (30 - 36) als Silberdrahtelektroden ausgebildet sind.
9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (30 - 36) als mit einer Chloridschicht versehene Silberdrahtelektroden ausgebildet sind.
10. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Elektrode (30 - 36) einen geraden Abschnitt (42, 46) aufweist.
11. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Elektrode (30 - 36) an ihrem vorderen Ende mit einer Spitze (44, 48) versehen ist.
12. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß zwei Elektroden (30 - 36) im wesentlichen symmetrisch zu einer Längsachse (24) des Trägers (22) angeordnet sind.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (30, 34) an ihrem freien Ende einen Abstand (d) zwischen 50  $\mu\text{m}$  und 800  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise zwischen 200  $\mu\text{m}$  und 500  $\mu\text{m}$  aufweisen.
14. Vorrichtung nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Elektrode (30 - 36) einen geraden Abschnitt (42, 46) aufweist und daß der gerade Abschnitt (42, 46) mit einer Längsachse (24) des Trägers (22) einen spitzen Winkel ( $\alpha$ ) einschließt.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der spitze Winkel ( $\alpha$ ) zwischen 3° und 10°, vorzugsweise 5° beträgt.
16. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Elektroden (30 - 36) als Meßelektrode (30, 34) ausgebildet ist.
17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Meßelektrode (34) an einen Meßverstärker (56) angeschlossen ist.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Meßverstärker (56) einstellbar (58) ist.
19. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Meßelektrode (30) an eine Stromquelle (50) angeschlossen ist.

20. Vorrichtung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Stromquelle (50) einstellbar (52) ist.
21. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Elektroden (30 - 36) als Referenzelektrode (32, 36) ausgebildet ist.
22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzelektrode (32) an eine Masse (54) angeschlossen ist.
23. Vorrichtung nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß zwei Meßelektroden (30, 34) und zwei Referenzelektroden (32, 36) vorgesehen sind.
24. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Meßelektroden (30, 34) in einer ersten gemeinsamen Ebene (35) angeordnet sind.
25. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei Referenzelektroden (32, 36) in einer zweiten gemeinsamen Ebene (37) angeordnet sind.
26. Vorrichtung nach Anspruch 24 und 25, dadurch gekennzeichnet, daß die erste und die zweite Ebene (35, 37) parallel zueinander verlaufen.

27. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Träger (22) mindestens eine Perfusatleitung angeordnet ist.
28. Vorrichtung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Perfusatleitung ein Perfusateinlaß (38) ist.
29. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Perfusateinlaß (38) eine erste Mündung (39) aufweist, daß der Perfusateinlaß (38) im wesentlichen parallel zu der mindestens einen Meßelektrode (30, 34) angeordnet ist, und daß die erste Mündung (39) oberhalb eines unteren Endes der mindestens einen Meßelektrode (30, 34) angeordnet ist.
30. Vorrichtung nach Anspruch 14 und 29, dadurch gekennzeichnet, der Perfusateinlaß (38) im wesentlichen auf der Symmetrieachse zwischen den Meßelektroden (30, 34) angeordnet ist.
31. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 27 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Perfusateinlaß (38) an eine Förderpumpe (70) angeschlossen ist.
32. Vorrichtung nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Förderpumpe (70) einstellbar (72) ist.
33. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 27 - 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Perfusateinsatz (38)



über ein steuerbares Ventilsystem an eine Mehrzahl von Vorratsbehältern anschließbar ist.

34. Vorrichtung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorratsbehälter oberhalb des Perfusateinlasses (38) angeordnet sind.
35. Vorrichtung nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Vorratsbehälter eine Testflüssigkeit enthält.
36. Vorrichtung nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Vorratsbehälter eine Spülflüssigkeit enthält.
37. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 27 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß die Perfusatleitung ein Perfusatauslaß (40) ist.
38. Vorrichtung nach Anspruch 29 und 37, dadurch gekennzeichnet, daß der Perfusatauslaß (40) eine zweite Mündung (41) aufweist, und daß die zweite Mündung (41) oberhalb der ersten Mündung (39) angeordnet ist.
39. Vorrichtung nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Mündungen (39, 41) entgegengesetzt gerichtet sind.
40. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 37 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß der Perfusatauslaß (40) an eine Saugpumpe (74) angeschlossen ist.

41. Vorrichtung nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß die Saugpumpe (74) einstellbar (76) ist.
42. Vorrichtung nach Anspruch 26, 28 und 37, dadurch gekennzeichnet, daß in Blickrichtung auf die erste Ebene (35) der Perfusateinlaß (38) vor der ersten Ebene (35) und der Perfusatauslaß (40) hinter der zweiten Ebene (37) angeordnet ist.
43. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 42, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Meßkopf (20) an einem Aktuator (18) angeordnet ist, und daß der Aktuator (18) entlang eines Koordinatensystems (14) oberhalb einer Aufnahme für die Zellen (16) verfahrbar ist.
44. Vorrichtung nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß der Aktuator (18) eine Mehrzahl von Meßköpfen (20, 20a, 20b) trägt.
45. Vorrichtung nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßköpfe (20) relativ zum Aktuator (18) mindestens entlang der auf die Zelle (16) gerichteten Achse (z) individuell verfahrbar sind.
46. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 43 bis 45, dadurch gekennzeichnet, daß der Meßkopf (20) steckbar oder schraubbar am Aktuator (18) befestigt ist.
47. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 46, dadurch gekennzeichnet, daß Mittel zum Injizieren von cDNA und/oder mRNA in die Zelle (16) vorgesehen sind.

48. Vorrichtung nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel am Aktuator (18) angeordnet sind.
49. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 43 bis 48, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufnahme für die Zellen (16) als standardisierte Multi-Well-Platte (10) ausgebildet ist.
50. Vorrichtung nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Aufnahmen (12) in der Platte (10) mit einer lesbaren Codierung (13) versehen sind und daß der Aktuator (18) Mittel zum Lesen der Codierung umfaßt.
51. Vorrichtung nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß die Codierung eine Bar-Codierung ist und die Mittel ein Bar-Code-Lesekopf (19) sind.

Zusammenfassung

Eine Vorrichtung dient zum Durchführen elektrophysiologischer Messungen an Zellen (16). Sie umfaßt einen Meßkopf (20). Der Meßkopf (20) ist mit mindestens einer Elektrode (30 - 36) zum Einstechen in die Zellen (16) versehen. Die Elektroden (30 - 36) sind in einen gemeinsamen Träger (22) integriert (Fig. 2).